

Synapsien karsimisen häiriö tyypin 1 etenevän myoklonusepilepsian (EPM1)
hiirimallissa

Erika Kuosa, LK
Folkhälsanin tutkimuskeskus ja
Medicum, HY

10.04.2020

Tutkielma

Ohjaaja: Saara Tegelberg, FT

Helsingin yliopisto
Lääketieteellinen tiedekunta
erika.kuosa@helsinki.fi

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Lääketieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution – Department Folkhälsanin tutkimuskeskus	
Tekijä – Författare – Author Erika Kuosa			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Synapsien karsimisen häiriö tyypin 1 etenevän myoklonusepilepsian (EPM1) hiirimallissa			
Oppiaine – Läroämne – Subject Lääketiede			
Työn laji – Arbetets art – Level Syventävä tutkielma	Aika – Datum – Month and year 04/2020	Sivumäärä – Sidoantal 37	
<p>Tiivistelmä – Referat – Abstract</p> <p>Tyypin 1 etenevä myoklonusepilepsia (Unverricht-Lundborgin tauti, EPM1) on nuoruusiässä alkava, peittyvästi periytyvä autosomaalinen monogeeninen hermorappeumasairaus. Geenimutaation takia <i>CSTB</i>-geeni ei tuota riittävästi kystatiini B -proteiinia, ja seurauksena on oirekuvaltaan etenevä neurodegeneratiivinen sairaus. Tyypioireina ilmenee lyhyitä ei-tahdonalaisia lihasnykäyskohtauksia (myoklonus), ataksiaa ja yleistyneitä epileptisiä kohtauksia. Tautiin ei nykyisellään ole saatavilla spesifiä hoitoa. Perustutkimus EPM1:n <i>Cstb</i>-puutteisessa (<i>Cstb</i>^{-/-}) hiirimallissa pyrkii selvittämään taudinkulun keskeisiä mekanismeja.</p> <p>Tutkimuksessa haluttiin selvittää mikroglia-hermotukisolujen ja komplementtijärjestelmän klassisen reitin yhteisroolia synapsien karsimisprosessissa <i>Cstb</i>^{-/-}-hiiren presymptomaattisessa vaiheessa tarkastelemalla <i>Cstb</i>^{-/-}-hiiren ja villityypin hiiren isoavoleikkeitä kahden ja neljän viikon iässä. Kudosleikkeistä tehtiin immunofluoresenssivärjäyssarjat eri presynaptisilla markkereilla (SYP, VGAT, VGLUT2) yhdessä komplementin klassisen reitin aloittajaproteiinin (C1q) ja mikrogliasolun vesikkeliproteiinin (CD68) vasta-aineiden kanssa. Värjätyt leikkeet kuvattiin konfokaalimikroskoopilla usean tarkennustason Z-stack-kuviksi, joita tarkasteltiin Imaris-kuva-analyysiohjelmalla.</p> <p>Kuukauden ikäisillä <i>Cstb</i>^{-/-}-hiirillä havaittiin suuremmat määrät SYP- ja VGLUT2-markkereiden kanssa kolokalisoitunutta C1q-proteiinia ja suurempi VGLUT2-synapsien kokonaismäärä. Löydös tuo uutta näkökulmaa EPM1:n patofysiologian tutkimukseen, joka aiemmin on keskittynyt inhibitorisen signaalinnin häiriöön. Tämä eksitatorisiin synapseihin painottuva poikkeavuus <i>Cstb</i>^{-/-}-hiiren varhaiskehityksellisessä synapsien karsimisprosessissa voi toimia taustatekijänä aikuisen <i>Cstb</i>^{-/-}-hiiren aivossa havaitussa eksitatoris-inhibitorisen signaalinnin epätasapainossa ja epileptisen hermoverkostorakenteen kehittämisessä.</p> <p>(173 sanaa)</p>			
<p>Avainsanat – Nyckelord – Keywords</p> <p>Epilepsy, Progressive Myoclonus Epilepsy, Unverricht-Lundborg Syndrome, Synaptic Pruning, Complement C1q, Microglia</p>			
<p>Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited</p> <p>Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto Helda</p>			
<p>Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information</p>			

Sisällys

1 Johdanto	1
2 Kirjallisuuskatsaus.....	2
2.1 Progressiivinen myoklonusepilepsia, EPM1	2
2.2 EPM1:n geneettinen tausta	2
2.3 EPM1:n kliininen kuva.....	5
2.4 EPM1:n patogeneettiset tekijät ja patogeneesin tutkimus <i>Cstb</i> ^{-/-} - hiirimallissa	6
2.5 Komplementtijärjestelmän klassinen reitti ja sen rooli synapsien kehityksellisen karsimisprosessin säätelijänä	8
3 Tutkimuksen tavoitteet	11
3.1 Synapsien karsimisen häiriö <i>Cstb</i> ^{-/-} -hiirimallissa.....	11
4 Aineisto ja menetelmät	13
4.1 Aineisto	13
4.2 Menetelmät	14
5 Tulokset	22
5.1 Lisääntynyt C1q:n ja presynaptisten markkereiden kolokalisaatio <i>Cstb</i> ^{-/-} - hiirellä P30-ikäpisteessä	22
5.2 Lisääntynyt eksitatoristen presynapsien terminaalien määrä <i>Cstb</i> ^{-/-} -hiirellä P30-ikäpisteessä	24
6 Pohdinta.....	25
6.1 Eksitatorisiin synapseihin painottuva synapsien karsimisen häiriö <i>Cstb</i> ^{-/-} - hiiren somatosensorisella korteksilla	25
6.2 Päälöydösten merkitys	26
6.3 Tutkimuksen luotettavuus ja merkitys.....	27
Lähteet.....	30
Liitteet	33

1 Johdanto

Tutkimuksessa kartoitettiin aivojen varhaiskehityksen aikaista synapsien karsimista ja sen merkitystä Unverricht-Lundborgin taudin (tyypin 1 etenevä myoklonusepilepsia, EPM1) patogeneesissä kystatiini B -puutteista (*Cstb*^{-/-}) hiirimallia hyödyntäen. Taudin taustalla on peittyvästi periytyvä mutaatio kystatiini B -geenissä (*CSTB*), minkä seurauksena geeni tuottaa riittämättömän määrän proteiinituotettaan. EPM1 on tyypillisesti 6-16 vuoden iässä alkava hermorappeumasairaus, jonka tyypioireita ovat asteittain paheneva kohtauksittainen myoklonus, ataksia ja yleistyneet toonis-klooniset epileptiset kohtaukset. Kudospatologian tyypipiirteinä havaitaan valkean aineen tuhoa ja aivojen volyymin surkastumista. Sairauteen ei tällä hetkellä ole saatavilla spesifiä hoitoa, minkä takia erityisesti myoklonusoireen hoitovaste on huono ja potilaiden toimintakyky merkittävästi heikentynyt.

Tässä projektissa tutkittiin aivojen postnataalisin varhaiskehityksen aikaista synapsien karsimisprosessia *Cstb*^{-/-}-hiiren isoavokudoksen jääleikkeissä. Kontrollina käytettiin terveen villityypin hiiren isoavoleikkeitä. Leikkeiden immunofluoresenssivärjäyksissä tutkittiin erityisesti komplementtijärjestelmän komponentti C1q:n kolokalisaatiota presynaptisten markkereiden kanssa aiemmin havaitun, taudille tyypillisen varhaisen patologisen mikroglia-aktivaation aikana ja tämän vaikutusta hiirimallin synapsien karsimisprosessiin (1, 2).

Lisääntynyt C1q:n vapautuminen ja mikroglia-aktivaatio on havaittu *Cstb*^{-/-}-hiiren aivoleikkeissä jo patogeneesiprosessin alkuvaiheissa (3). Lisäksi C1q-geenin ja useiden muiden pro-inflammatoristen geenien aktiivisuuden on havaittu lisääntyvän transkriptiotasolla osana tulehdusreaktiota. (3, 4) Tässä tutkimuksessa selvitettiin ensi kertaa komplementtijärjestelmän osuutta tulehdusreaktion lisäksi myös hermoverkoston kypsymisessä ja kehittämisessä EPM1:n patofysiologiassa. Oireita edeltävän eli presymptomaattisen vaiheen seuraamiseksi näitä mekanismeja tarkasteltiin 14 ja 30 päivän (postnatal day (P) 14 ja P30) ikäisissä hiirissä.

2 Kirjallisuuskatsaus

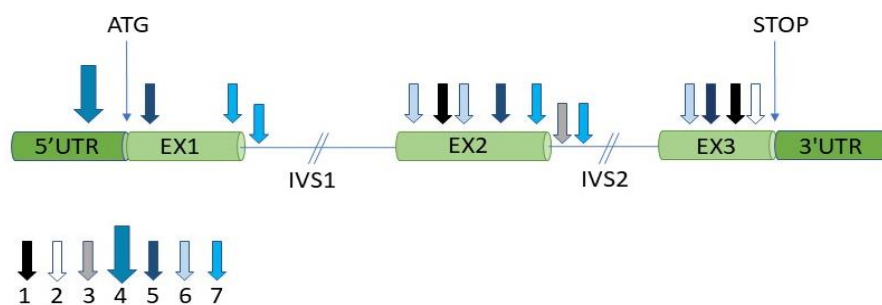
2.1 Progressiivinen myoklonusepilepsia, EPM1

Unverricht-Lundborgin tauti eli tyypin 1 etenevä myoklonusepilepsia (EPM1) on autosomaalinen peittyvästi periytyvä harvinainen hermorappeumasairaus. EPM1 on osa laajaa perinnöllisten etenevien myoklonusepilepsioiden tautiryhmää ja maailmanlaajuisesti se on näistä yleisin (5). Suomen ainutlaatuisen geneettisen isolaation johdosta EPM1 on rikastunut suomalaiseen väestöön osana niin kutsuttua suomalaista tautiperintöä (6). Nykyisellään Suomessa on maailman korkein EPM1:n prevalenssi (4:100 000). Suomen lisäksi tautia esiintyy runsaammin Pohjois-Afrikassa, Välimeren alueella ja niillä alueilla, joilla perustajanvaikutus tai kulttuuritaustasta johtuva konsangviniteetti on vaikuttanut tautialleelien rikastumiseen (5, 7).

2.2 EPM1:n geneettinen tausta

EPM1:n taudin ilmenemisen aiheuttaa resessiivinen mutaatio kystatiini B - proteiinia tuottavassa geenissä (*CSTB*), joka sijaitsee kromosomissa 21q22.3 (8). Kystatiini B on kysteiiniproteaasi-inhibiittori, joka osallistuu katepsiinien inhibointiin koko elimistössä. EPM1:ssa merkitystä vaikuttaa olevan *CSTB*:n puutteesta johtuvalla lisääntyneellä katepsiinien aktiivisuudella, mikä johtaa muun muassa hermosolujen apoptoosiin kaspasien proteolyyttisen aktivaation kautta. (9-11) EPM1:n molekyylibiologisen tutkimuksen edettyä kystatiini B:llä saattaa katepsiinivälitteisen funktionsa lisäksi olla muitakin fysiologisia tehtäviä, jota ei vielä tarkkaan tunneta (12).

Tautiin johtavia mutaatioita tunnetaan tähän mennessä 17 (15 ja kaksi julkaisematonta, kuva 1). Yleisin EPM1-genotyyppi suomalaisessa väestössä on 12 nukleotidia pitkän toistojakson (5'-CCCCGCCCGCG-3') n. 30-125 kertaa sisältävä ekspansiomutaatio homotsygoottisena (13). Tämä mutaatio käsittää n. 90% tautialleeleista maailmanlaajuisesti ja jopa 99% suomalaispotilaiden alleeleista (14). Alleelin periminen molemmilta vanhemmilta johtaa EPM1:n kehittymiseen tyypillisesti 6-16 vuoden iässä (ilmaantumishuippu 12-13 vuoden iässä).



Kuva 1. Kaaviokuva *CSTB*-geenin EPM1-tautiin liittyvistä julkaistuista mutaatioista. EPM1-geenivirheen aiheuttavien 15 julkaistun mutaation sijainti on merkattu geeniin värikoodatuin nuolin (1 – häviämä, 2 – kahdentuma, 3 – indel-mutaatio, 4 – toistojaksoalueen laajentuma, 5 – vaihtomutaatio, 6 – pysäytysmutaatio, 7 – silmukointikohtamutaatio). *CSTB*-proteiinia koodaavat kolme eksonia on kuvattu vihreillä sylintereillä ja proteiinia koodaamattomat intronit sinisellä viivalla. Translaation aloituskohta (ATG) ja lopetuskodoni (STOP) on merkattu kuvaan nuolella. Mukailtu ja päivitetty lähteestä Joensuu ym., 2008 (12).

Taudin eteneminen ja taudinkuvan vaikeutuminen vaihtelee huomattavasti eri potilaiden, jopa sisarusten, välillä. Syyt tähän ovat vielä melko huonosti tunnetut. Ekspansiomutaation toistojaksojen yhteispituudella ei tämänhetkisen käsityksen mukaan ole suurta vaikutusta taudinkuvaan homotsygoottipotilailla. Kahden erilaisen *CSTB*-mutaation yhdistelmägenotyyppi eli heterotsygotia on potilaiden joukossa harvinainen, mutta aikaansaa tyypillisesti oireiden aikaisemman alkuajankohdan ja nopeammin etenevän, vaikeamman oirekuvan, mikä johtuu todennäköisesti vähäisemmästä tuotetusta *CSTB*-proteiinin määrästä. (5, 12)

Hiljattain on myös kuvattu muutamia täydellisen CSTB:n puutteen aiheuttavan lukukehystä muuttavan mutaation suhteen homotsygotteja potilaita. Näissä harvinaisissa tapauksissa täydellinen CSTB:n puute aikaansaa erityisen vakavaoireisen taudinkuvan ja laajalti muita kehityksellisiä häiriöitä (15, 16). Potilaiden aivokuvantamisen löydökset ovat yhteneviä *Cstb*^{-/-}-hiirimallin löydösten kanssa, mutta täydellisen kystatiinin puutoksen taudinkuva on potilailla huomattavasti vakavampi kuin *Cstb*^{-/-}-hiirellä. Yhdessä nämä kliiniset löydökset tukevat hypoteesia taudinkuvan vaikeuden käänteisestä korrelaatiosta potilaalla tuotetun CSTB-proteiinin määrän kanssa, toisin sanoen, vakavampi CSTB:n puute aikaansaa potilaalla vakavamman taudinkuvan.

Mutaatio (lähde)	Mutaation tyyppi ja sijainti CSTB -geenissä	Arvioitu proteiinitason muutos
(CCCCGCCCCGCG) _{n>30} (15-17)	5'-pään johtosekvenssi, toistojaksoalueen laajentuma	<i>CSTB</i> :n vähentynyt ekspressio
c.10G>C (18)	1. eksoni, missense-mutaatio	p.(Gly4Arg)
c.66G>A (17)	1. eksoni, silmukointikohtamutaatio	Muuttunut silmukointi
c.67-1G>C (8, 18-20)	1. introni, silmukointikohtamutaatio	p. [=,Val23_Lys56del]
c.125C>A (21)	2. eksoni, nonsense-mutaatio	p.Ser42*
c.132-134del (22)	2. eksoni, deleetio	p.Lys44_Ser45delinsAsn
c.136C>T (23)	2. eksoni, nonsense-mutaatio	p.Gln46*
c.149G>A (24)	2. eksoni, missense-mutaatio	p.Gly50Glu
c.168G>A (25)	2. eksoni, silmukointikohtamutaatio	Muuttunut silmukointi
c.168 + 1_168+18del (23)	2. introni, indel-mutaatio	p.[Val23_Lys56del, Val57Glufs*28]
c.169-2A>G (8, 19, 26)	2. introni, silmukointikohtamutaatio	Muuttunut silmukointi
c.202C>T (8, 19, 26)	3. eksoni, nonsense-mutaatio	p.(Arg68*)
c.212A>C (26)	3. eksoni, missense-mutaatio	p.Gln71Pro
c.218_219delTC (19, 20, 27)	3. eksoni, deleetio	p.Leu73Profs*3
c.218dupT (16)	3. eksoni, duplikaatio	p.Ala5Argfs*19

Taulukko 1. EPM1-tautiin liittyvät *CSTB*-geenin tähän asti julkaistut mutaatiot.

2.3 EPM1:n kliininen kuva

EPM1:n ensioireena on tyypillisesti kohtauksittainen raajojen proksimaaliosissa esiintyvä yksittäisen lihaksen tai lihasryhmän nykiminen (myoklonus). Myoklonusoire pahenee asteittain taudin edetessä, vaikeutuu ja yleistyy stressin vaikutuksesta, ja esiintyy erityisesti ulkoisen ärsykkeen tai potilaan toiminnan, kuten liikkeen, provosoimana. Lähes puolella potilaista ensioireena havaitaan myoklonuksen sijaan yleistynyt jäykistys-kouristuskohtaus (generalized tonic-clonic seizure, GTCS). Taudin eteneminen voi myöhemmässäkin vaiheessa johtaa näihin toonis-kloonisiin kohtauksiin tai kaskadimaisiin, rajuihin, mahdollisesti tajunnan hämärtymistä sisältäviin myoklonuskohtauksiin (status myoclonicus). (14) Pikkuaivojen valkean aineen tuhon edettyä näiden oireiden rinnalle kehittyy yleisimmin kävelyvaikeutena ilmenevää ataksiaa, intentiovapinaa, dysartriaa ja posturaalista instabiliteettia (5, 14). Tässä vaiheessa myös myoklonusoireisto on tyypillisesti vakavasti toimintakykyä alentava.

Potilaiden kognitiivisiin toimintoihin EPM1:lla ei nykyäsityksen mukaan ole merkittävää vaikutusta. Psykomotorisen funktion alenema on havaittu kliinisissä kokeissa – tämän taustalla on todennäköisimmin myoklonuksesta ja ataksiasta johtuva mielen ja kehon koordinaation ongelma objektiivisesti mitattavan kognitiivisen funktion aleneman sijaan. EPM1-potilailla on lisäksi paljon psykiatrisia liitännäissairauksia, masennus on tavallista ja liittyy vakavan etenevän taudin aiheuttamaan psykologiseen kuormaan. Potilailla havaitaan myös emotionaalista labiliteettia. (14) Yhdessä nämä oireet voivat lopulta rajoittaa potilaan toimintakykyä hyvinkin laaja-alaisesti.

Mutatoituneiden alleelien yhdistelmästä ja muusta oirekuvan vaikeudesta riippuen EPM1 aiheuttaa potilaalle vaihtelevasti toimintakyvyn alenemista ja työkyvyttömyyttä, ja voi johtaa joissakin tapauksissa jopa pysyvään pyörätuolin käyttöön. Taudin eteneminen näyttää yleensä hidastuvan 5-10 vuoden progression jälkeen. Myoklonusoireiston hallintaan saaminen näyttää helpottavan myös ataksiaoireistoa. (5) Vanhemmilla potilailla sopimaton epilepsialääkitys korkea-annoksella fenytoiinihodoilla näyttää

myötävaikuttaneen vaikeamman taudinkuvan syntyyn ja elinajanodotteen lyhenemiseen jopa 15 vuodella (28) – nykyään vakavat taudinkuvat ovat harvinaisempia, ja EPM1-potilaiden elinajanodote ei tiettävästi ole lyhentynyt (14).

Elämänlaadun kannalta haitallisten, antiepileptiselle hoidolle reagoimattomien myoklonusoireiden hallintaan luo toivoa tulehdusreaktion tutkimus uutena patogeneettisenä tutkimuslinjana. Kliinisessä työssä potilaille voidaan suositella yleisterveiden ylläpitoa infektioiden ja tulehdustilojen välttämiseksi, mikä vaikuttaa lievittävän myoklonusoireistoa. EPM1:aan arvellaan siis liittyvän paitsi keskushermostollista, myös perifeeristä systeemistä inflammaatiota, joka myötävaikuttaa patologisissa prosesseissa vauhdittaen oireiden pahenemista.

2.4 EPM1:n patogeneettiset tekijät ja patogeneesin tutkimus *Cstb*^{-/-}-hiirimallissa

EPM1:n *Cstb*^{-/-}-hiirimalli mallintaa oirekuvaa hyvin sekä oireiden syntyajankohdan, tyypillisten piirteiden että niiden etenemisen suhteen, joskin hiiren oireisto on jonkin verran ihmisen oireistoa vakavampi (9). Tätä voi selittää osaltaan se, että *Cstb*^{-/-}-hiirellä CSTB-proteiinin tuotanto on kokonaan estetty, mutta EPM1-potilailla CSTB:n puute ei ole täydellinen: ekspansiohomotsygoottipotilailla *CSTB*-mRNA:n määrä on n. 10% terveiden verrokkien mRNA-määrästä, ja CSTB-proteiinitasot ja proteiinin inhibitorinen aktiivisuus ovat merkittävästi alentuneet (10, 24). Hiirimallissa kuvattu aivojen valkean aineen tilavuuden kato vastaa laadultaan potilailla kuvattuja valkean aineen muutoksia (29), mutta neuronikato etenee hiirellä nopeammin kuin potilailla ja on volyymiltaan suurempaa, selittäen erityisesti hankalammat ataksiaoireet. Erotuksena EPM1-potilaisiin *Cstb*^{-/-}-hiirellä ei myöskään esiinny toonis-kloonisia kohtauksia, ja myoklonusoire ilmenee vain unenaikaisesti (9).

Aikuisen *Cstb*^{-/-}-hiiren aivossa on havaittu lisääntynyt alttius kokeellisesti aiheutetuille epileptisille kohtauksille (30) sekä heikentynyt oksidatiivisen stressin sietokyky (31), jotka molemmat johtavat lisääntyneeseen neurodegeneraatioon.

Näille altistavia poikkeavuuksia on havaittu erityisesti inhibitorisen signaloinnin vähenemisenä GABA-välitteisissä signalointireiteissä, mitä on tarkasteltu geeniekspressiotasolla, elektrofysiologisin mittauksin ja immunohistokemiallisin metodein (3, 30).

Kudostasolla jo presymptomaattisessa vaiheessa (P14) *Cstb*^{-/-}-hiiren kehittyvässä aivossa havaitaan immunohistokemiallisissa värjäyksissä laaja gliasolujen aktivaatio, selkeänä tunnusmerkkinään talamokortikaaliseen systeemiin painottuva patologinen pro-inflammatorinen mikroglia-aktivaatio (4). Aktivoituneiden mikrogliasolujen runsaus näyttää voimistavan sentraalista tulehdusreaktiota, ja edeltää oireita aiheuttavaa neuronikatoa ja palautumattomia aivoparenkyymin muutoksia. Kun oireet alkavat kuukauden iässä, histopatologiassa havaitaan astrogliasolujen aktivaatio. Tähän mennessä myös ensimmäiset merkit neuronikadosta ovat havaittavissa. Aivokuoren volyymikato alkaa varsinaisesti muutaman kuukauden iässä edeten sekä isoavossa että pikkuaivossa. Neurodegeneraatioon liittyvä ataksiaoire ilmenee puolen vuoden iässä, jolloin pikkuaivoissa havaitaan voimakkaasti lisääntyntä jyväsolujen apoptoosia. (3, 4, 9)

Hiirimallissa on aiemmin osoitettu komplementtijärjestelmän proteiinien, erityisesti klassisen reitin aloittajaproteiinin C1q:n, geeniekspression olevan merkittävästi koholla kuukauden ikäisen *Cstb*^{-/-}-hiiren pikkuaivoissa kontrolliin verrattuna. Tulokset viittaavat myös muutoksiin immuuni- ja puolustusvasteissa, antigeenien prosessoinnissa ja esittelyssä, solustressissä, sytokiinien biosynteesissä, solu-solu-signaloinnissa, immuunipuolustuksen solujen migraatiossa ja useissa immuunijärjestelmän kannalta keskeisissä reseptoriaktiivisuuksissa. (3) EPM1:n tulehdusaktiiviteettia on karakterisoitu hiirimallissa paitsi keskushermoston tasolla, myös seerumin kemokiinien ja pro-inflammatoristen sytokiinien (IL-18, IL-1 α , CXCL-1, ym.) nousuna (32). Viimeaikaisena löydöksenä komplementin C1q kuitenkin vaikuttaa tulehdusreaktion lisäksi keskeisenä säätelijänä jo aivojen rakenteellisessa varhaiskehityksessä, ohjaten hermoverkostojen kypsymisen kannalta tärkeää synapsien karsimisprosessia (1, 2, 33). Karsimisprosessin patologista aktivaatiota on havaittu useiden psykiatristen ja neurodegeneratiivisten

sairauksien alkuvaiheessa. Uutena hypoteesina onkin ehdotettu, että *Cstb*^{-/-}-hiirellä havaittu C1q:n lisääntynyt tuotto voi viitata häiriöihin synapsien karsimisessa ja selittää EPM1:ssä havaittavan hypereksitabiliteetin synnyn taustaa hermoverkostojen muovautumisen kautta. (3, 4, 33, 34)

2.5 Komplementtijärjestelmän klassinen reitti ja sen rooli synapsien kehityksellisen karsimisprosessin säätelijänä

Komplementtijärjestelmä on evolutiivisesti hyvin säilynyt, keskeinen synnynnäisen ja hankinnaisen immunitetin osa sekä ihmisellä että muilla aitotumaisilla. Ihmisellä komplementin aktivaatio on keskeinen tulehdusreaktion aloittaja ja tehostaja kaikissa tulehdustiloissa. Komplementtijärjestelmän normaalin toiminnan häiriön synapsien karsimisen säätelijänä on arveltu olevan useiden neurologisten ja neuropsykiatristen sairauksien, kuten Alzheimerin taudin, glaukooman, ALS-taudin ja skitsofrenian, patogeneesin taustalla (1, 35-37). Aivojen varhaiskehitykseen kuuluvan synapsien karsimisprosessin häiriytyminen johtaa hermoverkostojen rakenteen epätasapainoon ja patologiseen fenotyyppiin. Varhaiskehityksen aikaisten ongelmien lisäksi karsimisprosessi voi epätarkoituksenmukaisesti uudelleenaktivoitua kehittyneessä aivossa, mikä myös johtaa hermoverkostojen rakenteen häiriöön (2, 33). Synapsien karsimisprosessi jatkuu ihmisellä nykytiedon mukaan jopa 20-30 vuoden ikään asti vaikuttaen keskeisesti aivojen fysiologiseen kehitykseen (36), ja prosessin häiriytyminen voi vaikuttaa aivosairauksien syntyyn perustavanlaatuisella tavalla.

Komplementtijärjestelmän klassinen reitti toimii aktiivisesti hermoverkostojen muovautumisprosessissa aivojen postnataalisena varhaiskehityksen aikana, jolloin uusia synapseja muodostetaan ja ylimääräisiä synapseja karsitaan pois (1). Kehittyvät astrosyytit säätelevät tämän dynaamisen prosessin aikana neuronien kehitystä erittäin useita solunulkoisia signaaliproteiineja ja vaikuttaen erityisesti funktionaalisten synapsien syntymiseen ja vahvistumiseen. Muovautumisprosessissa synapsien karsimisen osuudesta tiedetään kuitenkin toistaiseksi vähän. Aivotukisoluista mikrogliasolujen uskotaan olevan tässä

keskeisimpiä. (38, 39) Kehityksellisen synapsien karsimisen tiedetään perustuvan fagosytoosiin ja aksonien lysosomaaliseen hajotukseen (40). Lysosomaalinen hajotus tapahtuu mikroglia-solujen toimesta, ja EPM1-hiirimallissa havaittu aikainen, voimakas ja laaja-alainen mikroglia-aktivaatio voi vaikuttaa keskeisesti hermoverkoston muovautumiseen.

Komplementin klassisen reitin aloittajaproteiinia C1q:ta tuotetaan neuroneissa vasteena reaktiivisten astrosyyttien signaalimolekyyleihin (1), ja C1q:n lokalisaation synapseihin tiedetään toimivan synapsien fagosytoosia tehostavana signaalina mikroglia-soluille (2, 38). Suoran synapseihin sitoutumisen kautta välittyvän funktion lisäksi C1q:n tuotanto aktivoi komplementtikaskadin alavirran proteiinin, C3:n, tuotannon. C3:n tiedetään sitoutuvan pääasiassa patogeenien tai elimistön kuolleiden solujen ja kierrätettävien solurakenteiden pintaproteiineihin (opsonisaatio). Mikroglia-solu tunnistaa synapsiin sitoutuneen C3- tai C1q-proteiinin kalvoreseptorivälitteisesti ja hajottaa karsittavaksi merkityn synapsin fagosytoottisesti. Tarkkaa mekanismia karsittavaksi merkittyjen synapsien valikoitumiseen ei vielä tunneta, mutta mekanismin arvellaan olevan riippuvainen synaptisesta aktiivisuudesta ja mahdollisesti osa laajempaa plastisiteetin säätelyä ja synapsien uudelleenmuovautumista, jolloin vähemmän aktiiviset synapsit hajotetaan ja aktiivisimmat jäävät jäljelle (2, 38). Komplementtijärjestelmällä on muitakin tehtäviä, kuten C3:n kautta etenevä kohdesolun tuhoon johtava terminaalisen reitin aktivaatio ilman mikroglia-toimintaa, mutta nämä signaalireitit eivät tiettävästi ole merkittäviä synapsien karsimisprosessissa. (1, 41)

Komplementtijärjestelmän klassisen kaskadin osuutta kehittyvän aivon synapsien karsimisprosessissa on tutkittu aiemmin muun muassa hiiren retinogeenikulaarisissa systeemeissä. Glaukooman hiirimallissa suurin retinan gangliosolujen ekspressoima C1q:n määrä havaittiin hyvin varhaisessa vaiheessa kehitystä ikäpisteiden P5-P7 välillä, minkä jälkeen tasot kääntyivät huomattavaan laskuun, mutta aktivoituivat uudelleen myöhemmässä kehitysvaiheessa (1). Tutkimuksen tulokset osoittivat komplementtijärjestelmän klassisen reitin tärkeyden hermoverkoston varhaiskehityksessä ja sen aloittajaproteiinin C1q:n merkityksen synapsien karsimisprosessin säätelyssä ja

prosessin häiriöissä neurodegeneratiivisissa sairauksissa. Koska retinan hermoverkostojen loppuunkehitys tapahtuu isoaivoja aiemmin, tässä tutkimuksessa valittiin tarkasteltavaksi myöhemmät, EPM1-taudin hiirimallin patologian progression kannalta keskeisiksi havaitut ikäpisteet P14 ja P30. EPM1-taudissa komplementtijärjestelmän ohjaama synapsien karsiminen voi toimia hermoverkostojen patologisen kehityksen mekanismina jo varhaisvaiheessa kehitystä, ja kuten muissa neurodegeneratiivisissa sairauksissa on lisääntyvissä määrin osoitettu, myös kehittyneessä aivossa, johtaen neuroneiden solutuhoon ja aivoparenkyymin degeneratiivisiin muutoksiin (2, 36).

Syventävä tutkielma keskittyi tarkastelemaan EPM1-taudin hiirimallin presymptomaattisen vaiheen synapsien karsimisprosessia EPM1:n taudinkehityksen varhaisten patologisten prosessien havainnoimiseksi ennen lopullisia aivoparenkyymin muutoksia. Tätä aikaikkunaa voidaan pitää tärkeänä lähtökohtana myöhemmän taudin etenemisen kannalta, sillä hermoverkostojen varhaiskehityksellinen muovautuminen asettaa biologisen perustan aivojen rakenteelle ja toiminnalle koko elinkaarella ja saattaa osoittautua tärkeäksi terapeuttiseksi ikkunaksi taudinkulkuun vaikuttamisessa.

3 Tutkimuksen tavoitteet

3.1 Synapsien karsimisen häiriö *Cstb*^{-/-}-hiirimallissa

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää kudostasolla komplementtijärjestelmän klassisen reitin kaskadin aloittavan ja mikroglia-solujen fagosytoosia tehostavan C1q-proteiinin osuutta mikrogliavälitteisessä synapsien karsimisprosessissa. Koeasetelmassa tarkasteltiin synapsien karsimisprosessin etenemistä EPM1-tautimallin *Cstb*^{-/-}-hiirissä ja villityypin hiirissä kahdessa aikapisteessä, kahden viikon (postnatal day 14, P14) ja yhden kuukauden (P30) iässä. Näiden aikapisteiden on aiemmin havaittu kuvastavan hyvin tautiprosessin keskeisten kohtien eroja *Cstb*^{-/-}-hiiren ja villityypin hiiren välillä – ensimmäiset merkit EPM1:sta erottuvat kudostasolla patologisen voimakkaana mikroglia-aktivaationa P14-ikäisillä *Cstb*^{-/-}-hiirillä, ja neuronikato yhdessä reaktiivisen astrocytoosin kanssa alkaa ilmetä hiirillä P30-ikäisteen jälkeen symptomaattisen vaiheen alussa, ensimmäisten myöklonusoireiden ilmaantuessa (4). Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, onko presymptomaattisen vaiheen tyyppipiirteinä aiemmin havaittujen mikroglia-solujen morfologisilla eroilla immunohistokemiallisin metodein kuvannettavaa yhteyttä synapsien karsimisprosessin säätelyyn ja hermoverkostojen kehittymisen häiriöön.

Hiirimallin isoavoleikkeiden immunohistokemiallisessa analyysissä tutkittiin aktivoituneiden mikroglia-solujen ympäristössä runsaana esiintyvän komplementin C1q-proteiinin kolokalisaatiota eri synapsityyppien presynaptisten terminaalien kanssa. C1q:n lokalisoitumisen presynaptisiin terminaaleihin tulkittiin tarkoittavan synapsien merkitsemistä karsittavaksi fagosytoottisesti mikroglia-solujen toimesta. Komplementtia merkittiin C1q-vasta-aineella (complement component 1q, C1q) ja mikroglia-soluja CD68-vasta-aineella (cluster of differentiation 68, CD68). Presynaptisista merkkiaineista tarkasteluun otettiin synaptofysiini (SYP, yleinen presynaptisen terminaalin markkeri), GABA:n (gamma-aminovoihappo) vesikkelikuljetusproteiini (vesicular GABA transporter, VGAT; inhibitorisen presynaptisen terminaalin markkeri) ja glutamaatin vesikkelikuljetusproteiini 2 (vesicular glutamate transporter 2, VGLUT2;

eksitatorisen presynaptisen terminaalin markkeri). Valittujen vasta-aineiden biologinen funktio ja käyttö on selitetty ja perusteltu tarkemmin menetelmäosuudessa. Presynaptisten markkereiden kanssa kolokalisoituneen C1q-markkerin määrän lisäksi tarkasteltiin presynaptisten terminaalien kokonaismäärää. Lisäksi tallennettiin tarkempaa selvitystä varten tietoa mahdollisista eroista synapsikoossa *Cstb*^{-/-}-hiiren ja kontrollin välillä kunkin synapsityypin värjäyksissä.

Tarkempana tutkimuskysymyksenä haluttiin selvittää, näkyykö tautimallissa tietyntyyppisten synapsien karsimisprosessissa poikkeavuuksia, minkä takia tarkasteluun valittiin yleisen presynaptisen markkerin lisäksi erikseen yllä mainitut inhibitoristen ja eksitatoristen presynapsien markkerit. Aiemman datan perusteella oletettiin havaittavan eroja erityisesti GABAergisten eli inhibitoristen synapsien parametreissa, mutta ei glutamatergisissa eli eksitatorisissa synapseissa (3). Hermoverkoston kehityksen häiriön pohjalta kehittyvä eksitatoris-inhibitorinen epätasapaino tyyppipiirteensä GABAergisen signaaloinnin häiriö on EPM1:n patogeneesin kannalta keskeinen hypoteesi.

4 Aineisto ja menetelmät

4.1 Aineisto

4.1.1 Eettinen lupa

Eläinhankeluvan on hyväksynyt Etelä-Suomen aluehallintaviraston (ESAVI) hankelupalautakunta ELLA (päätös 10765/04.10.07/2015).

4.1.2 Hiirikanta

Tutkimuksen hiirikantana käytettiin *Cstb*^{-/-}-hiirikantaa (129/SvJ-*Cstb*^{tm1Rm}; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, MA; stock #003486). Kontrolliryhmänä käytettiin samanikäisiä villityypin hiiriä heterotsygoottiparituksista (129S2/SvHsd5).

Aineistoksi tutkimukseen valittiin satunnaisesti jokaista kuutta värjäystä kohden viisi *Cstb*^{-/-}-hiirtä ja viisi tervettä villityypin hiirtä (n=5 genotyyppiä kohden värjäyksen sisällä). Sukupuolijakauma pidettiin tasaisena, eikä EPM1-eläinmallilla tai -potilailla ole havaittu sukupuolieroja aiemmissa tutkimuksissa. Tutkimuskohteeksi aivoleikkeissä valittiin somatosensorisen korteksin S1-alue siellä aiemmin varmennetun presymptomaattisen vaiheen mikrogliaktivaation tutkimiseksi.

Värjäykset tehtiin kahdesta aiemmin patogeneesin etenemisen kannalta keskeiseksi tunnistetusta ikäpisteestä, P14 ja P30. Kummassakin ikäpisteessä suoritettiin kolme värjäystä, joissa kaikissa värjättiin markkerit CD68, C1q sekä jokin kolmesta presynaptisesta markkerista – SYP, VGLUT2 tai VGAT. Jokaisen yksilön aivoleikkeistä kuvattiin viisi kymmenkerroksista Z-stack-kuvaa konfokaalimikroskopiolla, ja kuvadata kvantifioitiin Imaris-kuva-analyysiohjelmalla käyttäen. Tutkimusvaiheet on selitetty tarkemmin menetelmät-osuudessa.

4.2 Menetelmät

4.2.1 Näytteiden kerääminen ja valmistelu

Hiiret vaivutettiin anestesiaan (Mebunat vet 60 mg/ml intraperitoneaali-injektio, 80-150 mg/kg, laimennus fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (phosphate-buffered saline, PBS), 1:5). Perfuusiota varten suoritettiin vasemman kammion transkardiaalipunktio, ja hiiret perfusoitiin hepariinilla (0.16 mg/ml, 10 minuuttia) ja paraformaldehydillä (4% PFA, 10 minuuttia).

Aivojen preparoimiseksi hiiret dekapitoitiin, leikattiin linja foramen magnumista korviin päin ja leikattiin kallo auki pikkuaivo-isoaivouurretta ja keskiuurretta pitkin. Pinseteillä poistettiin kallon luut, aivokalvot, hajukäämi ja näköhermot, minkä jälkeen irroteltiin aivot varovasti petrimaljalle. Preparoidut aivot puolitettiin keskiviivasta, jälkifiksoitiin 4% PFA:ssa 48 tunnin ajan ja upotettiin 30% sukroosiliuokseen säilytettäväksi +4°C lämpötilassa.

Aivopuoliskoista valmistettiin koronaalitason isoavoleikkeet, joista analysoitiin somatosensorisen korteksin S1-alueen kudospatologiaa. Jääleikkeet (40 µm) leikattiin kryostaatilla (Leica CM3050 S, kammiolämpötila -20°C, objektilämpötila -16°C, terä C35, leikkauskulma 5°) ja nosteltiin 96-kuoppalevyille TBSAF-liuokseen (30% etyleeniglykoli – 15% sukroosi – 0.05% NaN₃, 300 µl/kuoppa) missä ne säilytettiin +4°C lämpötilassa värjäyksen suorittamiseen asti.

4.2.2 Immunofluoresenssivärjäys

Värjäysmetodina käytettiin immunohistokemiallista fluoresenssivärjäystä (liite 1). Värjäysmetodissa valitaan kuvannettavaan kohdeproteiiniin sitoutuva spesifinen primaarinen vasta-aine, minkä jälkeen lisätään kohdeproteiini-vasta-aine-kompleksin primaariseen vasta-aineeseen sitoutuva sekundaarinen, fluoresoiva vasta-aine. Fluoresoiva vasta-aine toimii signaalina epifluoresenssi- ja konfokaalimikroskoopilla kuvantaessa. Jotta ylimääräistä taustasignaalia ei syntyisi, primaarisen vasta-aineen epäspesifi sitoutuminen muihin kuin

kuvannettaviin proteiineihin minimoidaan peittämällä nämä mahdolliset sitoutumispaikat seerumilla, joka sitoutuu epäspesifisesti kaikkiin näytteen proteiineihin ("blocking"). Aivokudoksen autofluoresenssi puolestaan minimoidaan pelkistämällä kudoksenäytteessä luonnostaan esiintyvät vapaat aldehydiryhvät ("quenching"), jotka muuten lähettäisivät fluoresenssisignaalia mikroskoopilla tarkasteltuna. Lisäksi pestään huolellisesti pois ylimääräiset reagenssi- ja vasta-ainejäämät jokaisen värjäysvaiheen lopuksi.

Aivoleikkeille käytettiin "free-floating"-värjäysmetodia, joka mahdollistaa paksumpien kudoksenleikkeiden tarkastelun ja kolmiulotteisen mallintamisen. Free-floating -metodia käytettäessä kudospala kelluu vapaasti nesteessä, ja tuloksena on parempi vasta-aineen kudospenetraatio verrattuna lasille kiinnitettyihin, paraffiiniin valettuihin leikkeisiin. Lisäksi tällä metodilla kryoleikkeissä kyseisten vasta-aineiden on aiemmin todettu antavan parempi signaali. Värjäysprotokollan optimoimiseksi ja työskentelyn sujuvoittamiseksi suoritettiin ensin koevärjäyksiä ennen varsinaisia tutkimusvärjäyksiä. Värjäysten suorittaminen ja kaikki tämän jälkeiset vaiheet ovat omaa työpanostani. Värjäysten työnkulku on kuvattu liitteenä olevassa värjäysprotokollassa (liite 1).

4.2.3 Käytetyt vasta-aineet

Komplementtijärjestelmän klassiselle reitille käytettiin markkerina kaikissa värjäyksissä C1q-vasta-ainetta, joka tunnistaa klassisen reitin kaskadin aloittajaproteiinin, C1q:n. Mikroglia-solujen markkerina käytettiin kaikissa värjäyksissä CD68-vasta-ainetta. CD68 on monosyyttilinjan solujen sytoplasmisissa granuloissa yleisesti esiintyvä transmembraaninen proteiini, jonka tiedetään lokalisoituvan mikroglia-solujen endosomien ja lysosomien yhteyteen. CD68:n ekspressio kasvaa mikroglia-aktivaation yhteydessä, joten markkeri kuvastaa tässä tapauksessa myös mikroglia-solujen fagosytoosin aktiivisuutta.

Presynaptisia markkereita valittiin kolme, jotta eri värjäyksissä voitiin tarkastella presynaptisten terminaalien määrää sekä yleisesti että erillisvärjäyksinä

inhibitorisista ja eksitatorisista synapseista. Ensimmäisessä värjäyksessä presynaptisena markkerina käytettiin synaptofysiiniä, joka on koko aivoissa ekspressoitu synapsirakkulan kalvoproteiini ja toimii siis yleismarkkerina presynaptisille terminaaleille. Toisessa värjäyksessä käytettiin markkerina VGLUT2:ta eksitatorisille presynaptisille terminaaleille ja kolmannessa VGAT:ia markkerina inhibitorisille presynaptisille terminaaleille. VGLUT2 on glutamatergisissa synapseissa synapsirakkulan kalvolla esiintyvä ioninkuljettajaproteiini, joka mahdollistaa glutamaatin pakkauksen synapsirakkuloihinsa. VGAT toimii vastaavasti inhibitorisissa synapseissa kuljettajaproteiinina mahdollistaen GABA:n pakkauksen synapsirakkuloihinsa.

Vasta-aineiden sopivuus kudokseen ja tässä käytetyt laimennokset oli validoitu aikaisemmassa vaiheessa sopiviksi. Primaaristen ja sekundaaristen vasta-aineiden pariutuminen ja laimennossuhteet on kuvattu oheisessa taulukossa (Taulukko 2).

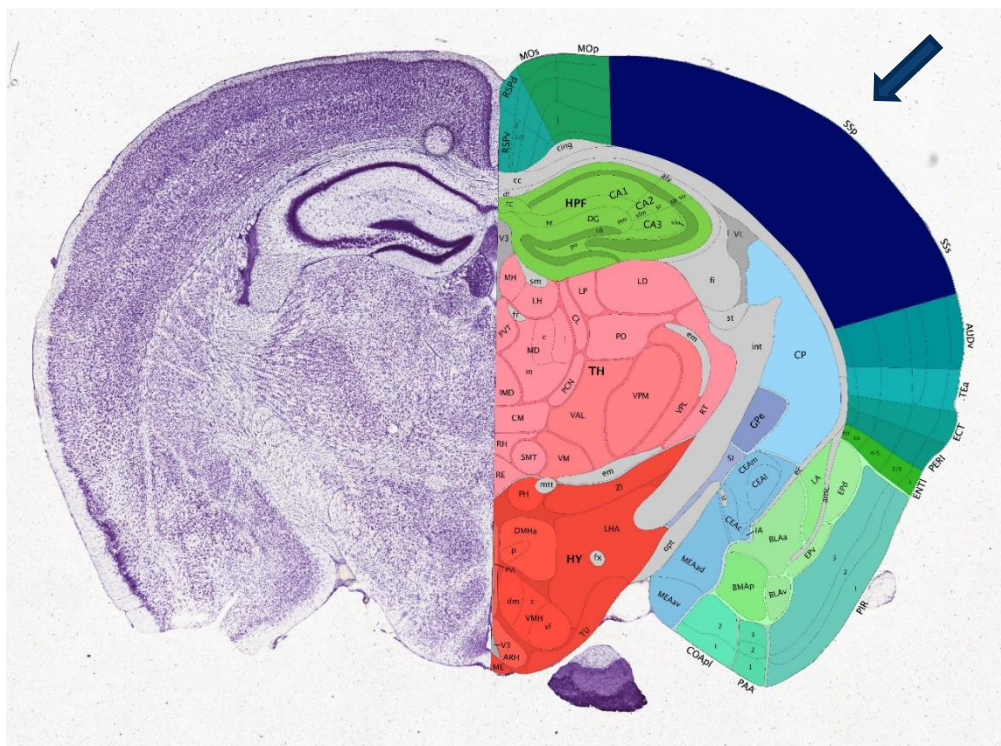
Primaariset vasta-aineet				Sekundaariset vasta-aineet	
CD68	1:500	mAb	+	rat 488	1:1000
SYP	1:250	mAb	+	mouse 594	1:1000
C1q	1:500	pAb	+	rabbit 647	1:1000
CD68	1:500	mAb	+	rat 488	1:1000
VGAT	1:250	mAb	+	mouse 594	1:1000
C1q	1:500	pAb	+	rabbit 647	1:1000
CD68	1:500	mAb	+	rat 488	1:1000
VGLUT2	1:500	mAb	+	mouse 594	1:1000
C1q	1:500	pAb	+	rabbit 647	1:1000

Käytetty vasta-aine	Tuotenumero ja valmistaja
Polyklonaalinen anti-C1q	A0136, Dako
Monoklonaalinen anti-CD68	MCA1957, Serotec
Monoklonaalinen anti-SYP	M0776, Dako
Monoklonaalinen anti-VGAT	#131011, Synaptic Systems
Monoklonaalinen anti-VGLUT2	#135421, Synaptic Systems
Alexa Fluor rat 488	A11006, Invitrogen
Alexa Fluor mouse 594	A21203, Invitrogen
Alexa Fluor rabbit 647	A31573, Invitrogen

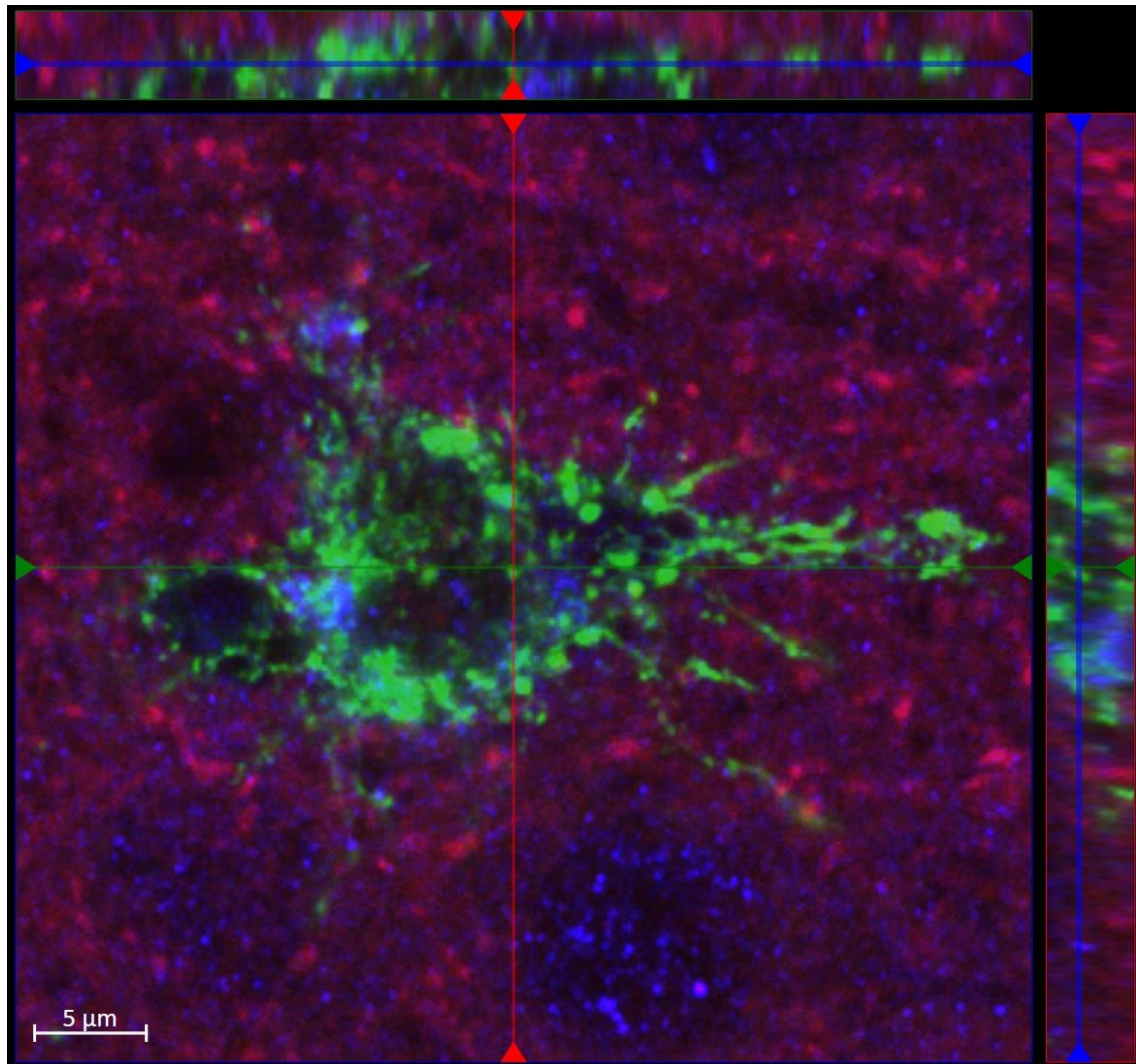
Taulukko 2. CD68-SYP-C1q-värjäyksissä, CD68-VGAT-C1q-värjäyksissä ja CD68-VGLUT2-C1q-värjäyksissä (ikäpisteet P14 ja P30) käytetyt primaariset ja sekundaariset immunohistokemialliset vasta-aineet. mAb = monoklonaalinen vasta-aine, pAb = polyklonaalinen vasta-aine.

4.2.3 Kuvantaminen konfokaalimikroskoopilla

Värjätyt näytteet kuvattiin fluoresoivia sekundaarisia vasta-aineita detektoivalla konfokaalimikroskoopilla (Zeiss LSM 780) käyttäen ZEN 2012 SP5 FP1 (v. 14.0.10.201) -kuvantamisohjelmaa. Jokaisesta eläimestä kuvattiin edustavana otoksena viisi kymmenkerroksista Z-stack-kuvaa isoaivojen koronaalileikkeestä somatosensoriselta korteksilta (SSp-alue, kuva 2). Z-stack-kuvantaminen mahdollistaa useamman tarkennustason kuvainformaation keräämisen valitusta näytteen kohdasta. Kuvan keskiöön asetettiin mikroglia solu sen ympäristössä sijaitsevien synapsien tutkimiseksi, ja mikroglia solua ympäröivät presynapsit ja C1q-proteiinit kuvattiin erillisillä kuvauskanavilla samaan kuvaan (kuva 3). Kuvausmetodi mahdollisti Z-stack-kuvien tarkastelun kolmiulotteisena kudosleikkeenä myöhemmässä analyysivaiheessa.



Kuva 2. Hiiren aivojen koronaalileike (P54). Vasemmalla Nissl-värjätty toisen aivopuoliskon koronaalileike ja oikealla siitä muodostettu kaavio aivoalueista. Somatosensorinen korteksi SSp on merkitty kuvaan sinisellä. Muokattu seuraavan pohjalta: Allen Institute for Brain Science, Allen Mouse Brain Atlas, 2004.

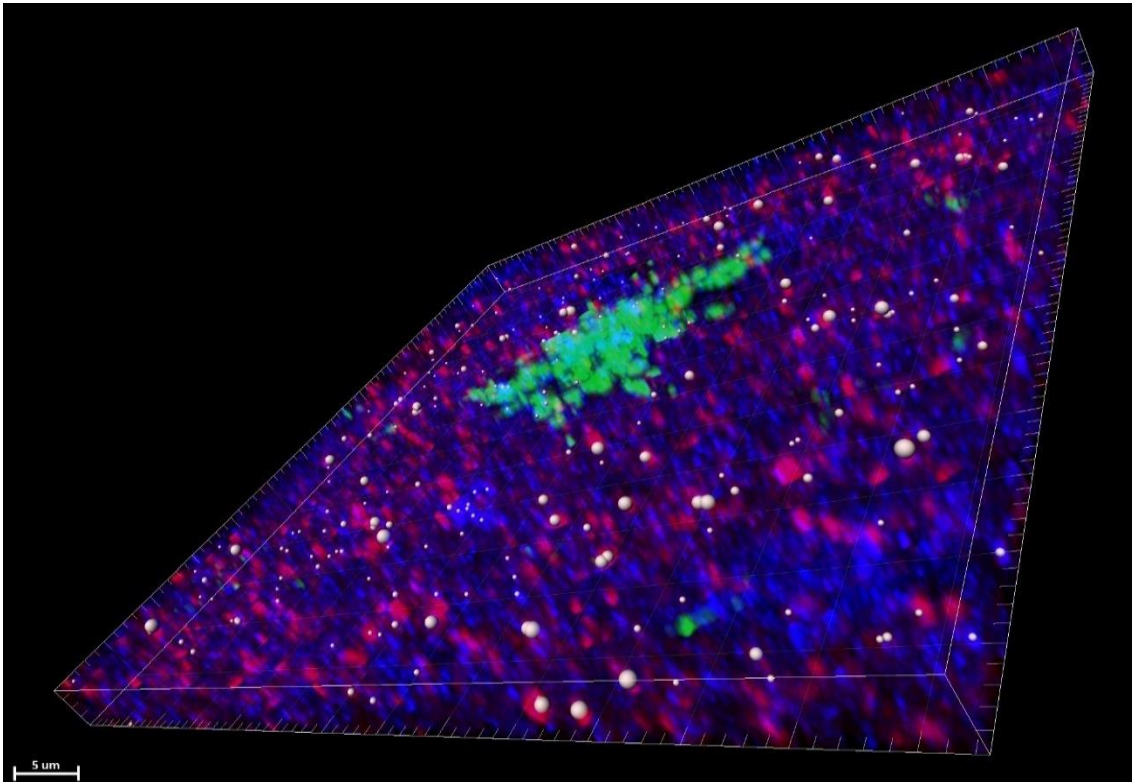


Kuva 3. VGLUT2-C1q-CD68-värijäys kuvattuna konfokaalimikroskoopilla ZEN-kuvantamisohjelmalla. Kuvassa P30-ikäisen *Cstb*^{-/-}-hiiren patologistesti aktivoitunut mikrogliasolu (CD68, vihreällä), jonka ympäristössä olevat presynaptiset markkerit (VGLUT2, punaisella) ja C1q-markkerit (C1q, sinisellä) kuvataan kolmiulotteisina usean tarkennustason Z-stack-leikkeinä.

4.2.4 Kuvien analysointi Imaris-kuva-analyysiohjelmalla

Kerätyt Z-stack-kuvat analysoitiin Imaris-kuva-analyysiohjelmalla (Imaris x64 v. 9.1.0, build 45585, Bitplane AG), joka mahdollistaa markkereiden kvantitatiivisen ja kolmiulotteisen tarkastelun suhteessa toisiinsa (kuva 4). CD68-markkerilla värjäytyneet mikrogliasolut erotettiin omaksi tasokseen ja tason parametrit määritettiin mikroglia-aktivaation voimakkuuden mukaan solukohtaisesti. Presynaptiset SYP-, VGAT- tai VGLUT2-markkerit ja C1q-markkerit erotettiin pisteinä omiksi tasoikseen, ja näiden parametrit määritettiin samoiksi kaikille eläimille yhden värjäyksen sisällä, värjäyskohtaisesti valitun pilottikuvasarjan (10 kuvaa) keskiarvon perusteella.

Synapsimarkkereiden ja C1q-markkerin kolokalisaatiota tutkittiin MatLab-työkalulla (MatLab R2016a, 9.0.0.341360) niin, että lähempänä kuin 0.5 μm etäisyydellä toisistaan olevat synapsit ja C1q-kertymät tulkittiin kolokalisoituneiksi. Markkereiden värjäämistä synapseista tallennettiin lisäksi tilavuus- ja lukumäärädataa jatkoanalyysia varten, sillä näytteissä havaittiin silmämääräisesti vaihtelua P14-aikapisteellä. Lisäksi luotiin oma tarkastelutaso lysosomien sisällä oleville eli niiden kanssa kolokalisoituneille synapseille mahdollista jatkoselvitystä varten.



Kuva 4. Markkereiden analysointi Imaris-kuva-analyysiohjelmalla. Presynaptisten VGLUT2-markkereiden (punainen) kanssa kolokaloituneet komplementin C1q-markkerit (sininen) on mallinnettu palloilla (valkoinen). CD68-markkeri omana tasonaan kuvan keskiössä (vihreä).

4.2.5 Tilastollinen analyysi

Saatu data analysoitiin GraphPad Prism (v. 5.0d) -ohjelmalla. Analyysit suoritettiin värjäyskohtaisille kokonaissynapsimäärille sekä C1q-markkerin kanssa kolokaloituneiden presynaptisten markkereiden määrille. Datalle suoritettiin yksisuuntainen varianssianalyysi (one-way ANOVA), jolla selvitetään, poikkeavatko mitatut arvot tilastollisesti merkittävällä tavalla vertailuarvoista ottamatta kantaa poikkeaman suuntaan. Näin voitiin vertailla valittujen aikapisteiden sisällä ominaisuuksia, joihin vaikuttaa yksi tekijä, eli tässä tapauksessa eroja *Cstb*^{-/-}-hiiren ja kontrollina toimivan villityypin hiiren välillä kokonaissynapsien määrässä ja C1q:n kanssa kolokaloituneiden synapsien määrässä. Testiarvoille suoritettiin monivertailun takia Bonferronin korjaus merkitsevyystasolla 0.05.

5 Tulokset

5.1 Lisääntynyt C1q:n ja presynaptisten markkereiden kolokalisaatio *Cstb*^{-/-}-hiirellä P30-ikäpisteessä

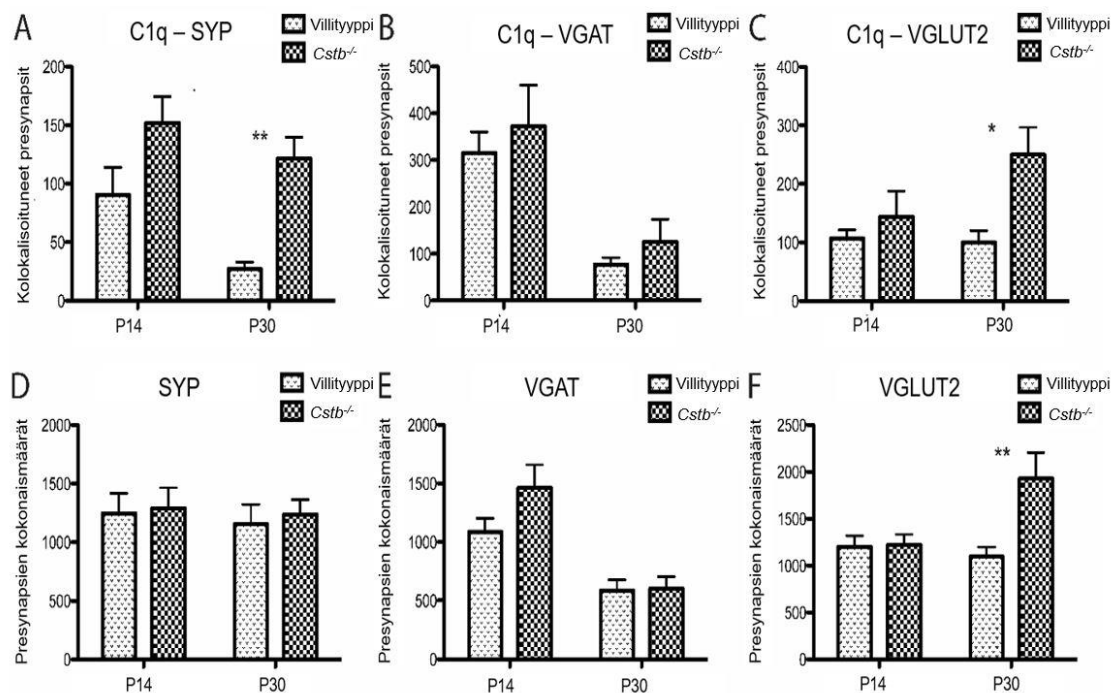
C1q:n voitiin havaita kolokaloituvan selkeästi presynaptisten markkereiden kanssa. C1q-SYP-värjäyksessä havaittiin *Cstb*^{-/-}-hiirellä merkittävästi enemmän SYP- ja C1q-markkereiden kolokalisaatiota kontrolliin verrattuna P30-ikäpisteessä (kuvat 4A, 5A ja 5D). P14-ikäpisteessä *Cstb*^{-/-}-hiiren ja kontrollin välillä vaikutti olevan samansuuntainen ero, joka jäi kuitenkin alle tilastollisen merkitsevyystason.

C1q-VGAT-värjäyksessä ei havaittu kolokalisaatiossa tilastollisesti merkitseviä eroja *Cstb*^{-/-}-hiiren ja kontrollin välillä kummassakaan ikäpisteessä (kuva 4B). Kolokaloituneiden VGAT-presynapsien määrän voitiin kuitenkin nähdä olevan sekä *Cstb*^{-/-}-hiirellä että kontrollilla selvästi matalampi ikäpisteessä P30 verrattuna ikäpisteeseen P14. Vastaava suunta C1q-kolokaloituneiden synapsien määrissä havaittiin myös C1q-SYP-värjäyksessä. Koska värjäysteknisistä syistä johtuvaa eroa ei voitu täysin sulkea pois, värjäyksissä ei kuitenkaan suoritettu P14- ja P30-ikäpisteiden tilastollista vertailua.

C1q-VGLUT2-värjäyksessä havaittiin *Cstb*^{-/-}-hiirellä tilastollisesti merkitsevästi enemmän C1q-VGLUT2-kolokalisaatiota kontrolliin verrattuna P30-ikäpisteessä, mutta ei P14-ikäpisteessä (kuvat 4C, 5B ja 5E). Lisäksi C1q-VGLUT2-kolokalisaation määrä näytti olevan *Cstb*^{-/-}-hiirellä P30-ikäpisteessä suurempi kuin P14-ikäpisteessä, toisin kuin muissa värjäyksissä. Värjäysteknisistä syistä myöskään näiden ikäpisteiden välillä ei kuitenkaan suoritettu tilastollista vertailua.

Tulosten perusteella isoavokuorella havaitut erot komplementin klassisen kaskadin C1q:n ja presynaptisten terminaalien kolokalisaatiossa painottuvat eksitatorisiin synapseihin (VGLUT2) ja näkyvät myös yleisen presynaptisen markkerin (SYP) värjäyksessä lisääntyneenä C1q-SYP-kolokalisaationa.

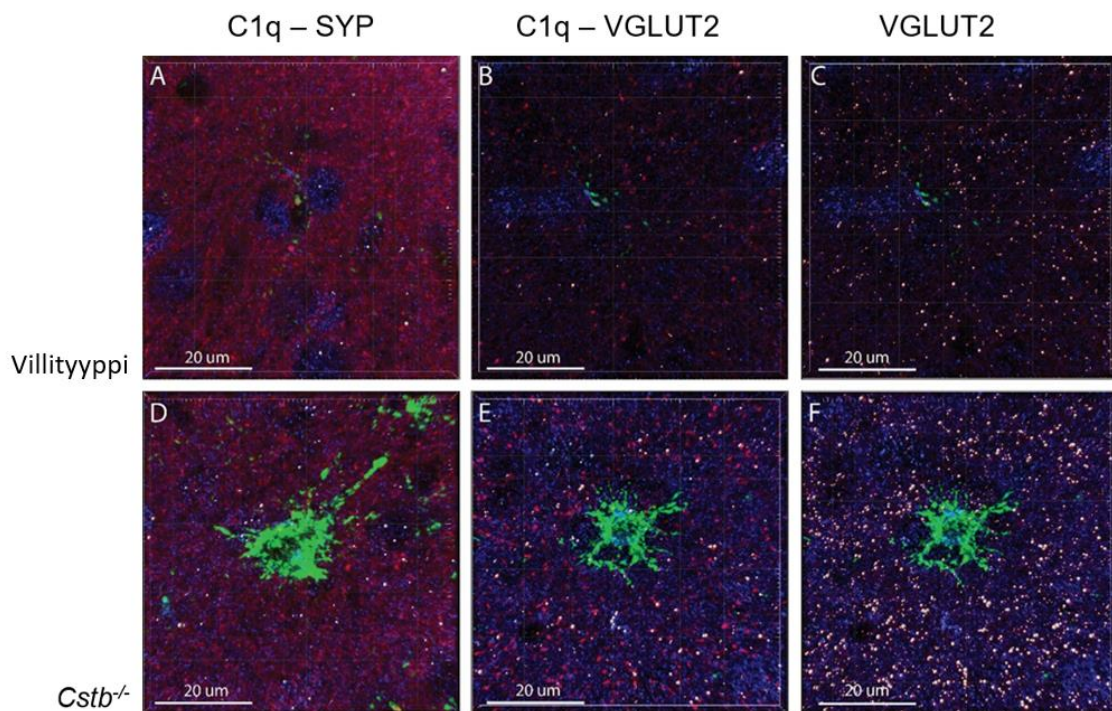
Tilastollisesti ero havaittiin kummassakin tapauksessa vain P30-ikäpisteessä, mutta myöhemmin analysoitavat värjäykset presymptomaattisessa vaiheessa ikäpisteissä P7 ja P21 voivat paljastaa myös aiemmin havaittavia eroja karsimisprosessissa sekä antaa mahdollisuuden tarkastella pitempää ajallista jatkumoa. Inhibitoristen synapsien (VGAT) karsintaprosessissa ei isoavokuorella havaittu tämän tutkimuksen perusteella merkitseviä eroja *Cstb*^{-/-}-hiiren ja kontrollin välillä.



Kuva 4. GraphPad Prism -statistiikkaohjelmalla tuotetut analyysit presynaptisten markkereiden ja C1q-markkerin kolokalisaatiosta (kuvat A, B ja C, yläriivi) ja presynaptisten markkereiden kokonaismääristä (kuvat D, E ja F, alariivi) aikapisteissä P14 ja P30.

5.2 Lisääntynyt eksitatoristen presynapsien terminaalien määrä *Cstb*^{-/-}-hiirellä P30-ikäpisteessä

Värjäyksissä ei todettu tilastollisesti merkitseviä eroja presynaptisen yleismarkkerin (SYP) tai inhibitoristen synapsien markkerin (VGAT) kokonaismäärän suhteen *Cstb*^{-/-}-hiiren ja kontrollin välillä aikapisteissä P14 tai P30 (kuvat 4D ja 4E). Eksitatoristen presynaptisten terminaalien (VGLUT2) värjäyksessä havaittiin kuitenkin P30-ikäpisteessä *Cstb*^{-/-}-hiirellä selvästi kontrollia suurempi, tilastollisesti merkitsevä VGLUT2-positiivisten terminaalien kokonaismäärä (kuvat 4F, 5C ja 5F). P14-ikäpisteessä tätä eroa ei nähty.



Kuva 5. Merkittävimmät löydökset P30-ikäpisteessä Imaris-kuvantamisohjelmalla kuvattuna. Ikäpisteessä P30 SYP- ja VGLUT2-värjäyksissä *Cstb*^{-/-}-hiirellä havaitaan enemmän C1q:n kanssa kolokaloituneita, poistettavaksi merkittyjä presynapseja (kuvat 5A ja 5D, SYP; kuvat 5B ja 5E, VGLUT2; kolokalisaatio valkoisella), sekä *Cstb*^{-/-}-hiirellä suurempi eksitatoristen synapsien kokonaismäärä (kuvat 5C ja 5F, VGLUT2; presynaptiset terminaalit valkoisella).

6 Pohdinta

6.1 Eksitatorisiin synapseihin painottuva synapsien karsimisen häiriö *Cstb*^{-/-}-hiiren somatosensorisella korteksilla

Cstb^{-/-}-hiirellä havaittu C1q:n lisääntynyt määrä ja kolokalisaatio presynaptisten markkereiden kanssa tukee hypoteesia häiriytyneestä C1q-välitteisestä synapsien karsimisesta *Cstb*^{-/-}-hiiren presymptomaattisessa vaiheessa. Tilastollisesti merkittävä ero C1q:n ja presynaptisten markkereiden kolokalisaatiossa *Cstb*^{-/-}-hiirellä kontrolliin verrattuna havaittiin P30-aikapisteessä sekä eksitatorisissa presynapseissa (C1q-VGLUT2-värjäys, kuvat 4C, 5B ja 5E) että myös yleisemmin presynaptisissa terminaaleissa (C1q-SYP-värjäys, kuvat 4A, 5A ja 5D). Tämän havainnon ja *Cstb*^{-/-}-hiirellä P30-aikapisteessä lisäksi havaitun eksitatoristen VGLUT2-synapsien ylimäärän perusteella (kuvat 4F, 5C ja 5F) eksitatoristen synapsien karsimisen voisi tulkita olevan siinä määrin puutteellista, että P30-aikapisteessä *Cstb*^{-/-}-hiirellä on kontrolliin verrattuna ylimäärä karsittavaksi merkittyjä eksitatorisia synapseja. *Cstb*^{-/-}-hiiren mikroglia solujen fagosytoosikapasiteetti ei mahdollisesti ole näiden synapsien poistamiseen riittävää, mistä seuraa eksitatoristen synapsien lopullisesti jäljelle jäävä ylimäärä presymptomaattisen kauden loppupuolella.

Inhibitoristen synapsien kolokalisaatiossa ja kokonaismäärissä ei havaittu eroja *Cstb*^{-/-}-hiiren ja kontrollin välillä kummassakaan tarkastellussa aikapisteessä. Tämä poikkesi hiirimallissa aiemmin kerätyn transkriptomiikka- ja elektrofysiologiadatan perusteella asetetusta hypoteesista, jonka mukaan inhibitoristen synapsien määrän oletettiin olevan *Cstb*^{-/-}-hiirellä kontrollia pienempi (3). Presynaptisten terminaalien kokonaismäärissä ei myöskään nähdä tässä vaiheessa muutoksia, vaan häiriö vaikuttaa näkyvän vain eksitatoris-inhibitorisena epätasapainona. Häiriö synapsien karsimisessa voi siis johtaa fenotyyppillisesti eksitatorisen signaaloinnin ylimäärään ja ärsytysherkkyiden lisääntymiseen isoavokuorella. Ajallisesti häiriö karsimisprosessissa ja lisääntynyt mikroglia solujen tulehduksellinen aktivaatio näkyvät yhtä aikaa ensimmäisten oireiden ilmenemisen kanssa ja ovat todennäköisesti taudinkulkuun myötävaikuttava mekanismi.

Yleisenä havaintona SYP- ja VGAT-värjäyksissä nähtiin sekä *Cstb*^{-/-}-hiirellä että kontrollilla P30-ikäpisteessä sama määrä tai vähemmän synapseja ja presynaptisten markkereiden ja C1q:n kolokalisaatiota kuin P14-ikäpisteessä, mikä osaltaan saattaa viitata toimivaan synapsien karsimiseen näiden ikäpisteiden välillä. SYP- ja VGAT-värjäyksistä poiketen sekä VGLUT2-synapsien kokonaismäärä että C1q-VGLUT2-kolokalisaation määrä olivat *Cstb*^{-/-}-hiirellä suuremmat P30-ikäpisteessä kuin P14-ikäpisteessä. Myös tämän havainnon voisi tulkita merkiksi eksitatoristen presynapsien riittämättömästä karsimisesta samalla, kun uusia synaptisia yhteyksiä muodostetaan.

Yhteenvetona tulokset sopivat siihen, että komplementtijärjestelmän klassista reittiä käytetään voimakkaasti synapsien poistettavaksi merkitsemiseen karsimisprosessin edetessä, mutta *Cstb*^{-/-}-hiirellä mikroglia-solut karsivat merkittäviä eksitatorisia synapseja isoaivojen somatosensorisella korteksilla puutteellisesti samalla, kun uusia synapseja muodostetaan jatkuvasti. Heikentyneestä synapsien karsimiskapasiteetista seuraa symptomaattisen vaiheen kynnyksellä havaittava eksitatoristen synapsien ylimäärä. Isoaivokuoren eksitatoristen synapsien karsimisen häiriön mekanismin selvittämiseksi tarvitaan kuitenkin uusia mekanistisia tutkimuksia ja lisänäyttöä.

6.2 Päälöydösten merkitys

Eksitatorisissa, mutta ei inhibitorisissa, presynapseissa havaittava synapsien karsimisen häiriö poikkeaa aiemmasta inhibitorisen signaloinnin häiriöön painottuvasta tutkimuslinjasta (3) eikä vahvasta tutkielmassa asetettua hypoteesia inhibitoristen synapsien voimakkaammasta karsimisesta. On kuitenkin huomioitava, että EPM1:aan liittyvää eksitatoris-inhibitorista epätasapainoa ei ole aiemmin tarkemmin tutkittu isoaivoissa, ja taudin patogeneesin taustalla voi olla yhdistelmä eksitatorisen signaloinnin ylimäärää isoaivokuoren tasolla ja inhibitorisen signaloinnin puutetta pikkuaivotasolla. Lisäksi aiemmin *Cstb*^{-/-}-hiiren pikkuaivojen elektrofysiologisissa mittauksissa on havaittu lisääntyntä eksitatorista signalointia Purkinjen soluissa (3), minkä kaltaista fenotyyppiä nyt isoaivoissa havaittu eksitatoristen presynapsien

ylimäärä voisi heijastaa. Samankaltaisia löydöksiä juuri eksitatoristen synapsien ylimäärästä synapsien karsimisprosessin häiriön yhteydessä on havaittu myös C1q-puutteisessa hiirimallissa, ja pikkuaivoissa C1q-alaluokkien proteiinien on todettu toimivan Purkinjen solujen synaptisten yhteyksien säätelijöinä monien muiden aivoalueiden lisäksi (33, 34).

Cstb^{-/-}-hiiren riittämätön C1q-välitteinen eksitatoristen synapsien karsiminen ja tästä seuraava suurempi eksitatoristen synapsien kokonaismäärä voi todennäköisesti johtaa eksitatoris-inhibitorisen epätasapainon korostumiseen, hermoverkoston muovautumisen häiriöön ja epileptiseen fenotyyppiin. On mahdollista, että tämä mekanismi toimii myös EPM1-potilailla epileptisille oireille ja kohtauksille alttiutta lisäävänä tekijänä. Kuten useissa muissa neurodegeneratiivisissa sairauksissa, häiriöt synapsien karsimisessa jo taudinsynnyn varhaisvaiheessa luovat tärkeän perustan oireiden kehitykselle ja pysyvyydelle taudin myöhäisvaiheessa (2, 35, 36, 38). Mikäli tulevat tutkimukset lisäävät tietoa eksitatorisen signaloinnin häiriöstä, voivat nämä löydökset tarjota lisänäyttöä tulevaisuudessa myös uusien lääkitysvaihtoehtojen soveltamiseen EPM1-potilaiden vaikeasti hallittavan oireiston kanssa.

6.3 Tutkimuksen luotettavuus ja merkitys

Tutkimuksessa käytettiin kahta aikapistettä, mikä mahdollisti patofysiologisten erojen etsimisen sekä presymptomaattisessa vaiheessa ensimmäisten kudostuutosten ilmaantuessa että symptomaattisen vaiheen kynnyksellä. Vaikka aikapisteitä on määritetty vain kaksi, voisi synapsien karsimisprosessin etenevän luonteen perusteella olettaa tilanteen kehittyvän tällä aikavälillä enemmän lineaarisesti kuin fluktuoiden. Värjäyssarjaa täydennetään jatkossa suorittamalla samat analyysit aikapisteiden P7 ja P21 värjäyksille, jolloin dataa voidaan tarkastella aidosti ajallisena jatkumona ja synapsien karsimisen häiriöstä EPM1:n hermoverkoston kehityshäiriöön vaikuttavana tekijänä voidaan muodostaa tarkempi kuva.

Tutkimuksen metodologisena rajoitteena voidaan kenties pitää hiiren aivokudosleikkeiden tarkastelua immunohistokemiallisin metodein, jolloin mahdollisuus yhdistää havaittujen kudostuutosten merkitys oirekuvaan puuttuu. Jokaisella *Cstb*^{-/-}-hiirellä on kuitenkin todennettu *Cstb*-geenin hiljentyminen, ja koska CSTB-proteiinin tuotanto on tällöin lähes täysin estetty, voidaan kudosleikkeitä pitää vertailukelpoisina patofysiologisten erojen havaitsemiseksi tautimallin *Cstb*^{-/-}-hiiren ja terveen villityypin hiiren välillä. Kuten oireet, myös patofysiologiset muutokset voivat olla hiirellä vahvemmin löydettävissä kuin ihmisellä, johtuen CSTB:n täydellisestä puutteesta potilaiden vain osin puutteellisen tuotannon sijaan. Vaikka genotyyppejä ja värjäyssarjoja ei voitu sokkouttaa histologiassa ilmeisen havaittavien erojen takia, näytteitä kohdeltiin samalla tavalla riippumatta genotyypistä ja värjäyksestä.

Kuten kaikilla eläinmalleilla, hiiren biologia poikkeaa ihmisestä monilla tunnetuilla ja tuntemattomilla tavoilla, eivätkä hiirimalleissa havaitut erot ole suoraan yleistettävissä ihmiseen. *Cstb*^{-/-}-hiirimalli kuitenkin mallintaa EPM1:n ilmiä hyvin ja tarjoaa järkevän alustan oireiden patofysiologisen taustan tutkimiseen (9, 12). EPM1-potilailla tehtyjä tutkimuksia mikrogliakäiväation merkityksestä tai synapsitasen muutoksista ei ole, mutta myöhemmän sairausvaiheen EPM1-potilaiden magnetoenkefalografiatutkimuksissa (MEG) on havaittu sensorimotorisen talamokortikaalisen systeemin hyperreaktiivisuutta, MRI-kuvantamistutkimuksissa sensorimotorisen aivokuoren ohenemista, ja diffuusiotensorikuvantamistutkimuksissa (DTI) laajaa valkoisen aineen katoa hiirillä ja potilailla yhtenevillä alueilla (29, 42, 43). MEG-tutkimustuloksiin sopien *Cstb*^{-/-}-hiirimallissa on todettu somatosensorisen talamokortikaalisen systeemin neuronikatoa, joka korreloi mikrogliakäiväation kanssa (4). Potilailla ja hiirimallissa havaitut löydökset liittyvät todennäköisesti EPM1:ssä keskeisiin motorisiin ja epileptisiin oireisiin. Tämän tutkimuksen tulokset mikrogliakäiväatioon liittyvästä eksitatoristen synapsien karsimisen häiriöstä somatosensorisella kuorella ovat hyvin linjassa aiemman näytön kanssa, ja mahdollisesti selittävät näiden sensorimotoriseen talamokortikaaliseen systeemiin painottuvien löydösten taustaa. Näyttö synapsien karsimisen häiriöstä monissa muissa neurodegeneratiivisissa sairauksissa tukee hypoteesia karsimisprosessin häiriön merkityksestä tautiprosessin alkuvaiheilla (1, 2, 35-37).

Synapsien karsimisen häiriön merkitys EPM1:n patogeneesissä ja sen assosiaatio myöhempään oirekuvaan vaatii kuitenkin lisätutkimuksia.

Tutkimuksen tulokset muistuttavat, että lisänä aiempaan näyttöön inhibitorisen signaloinnin häiriöstä EPM1:ssa myös eksitatorisella signaloinnilla voi olla isoavotasolla vaikutusta inhibitorisen ja eksitatorisen signaloinnin väliseen epätasapainoon ja hermoverkostojen poikkeavaan, epilepsialle altistavaan ärtyvyyteen. Tämä tutkimussuunta osoittaa tarvetta hermoverkostojen muovautumisen lisätutkimukselle ja voisi tulevaisuudessa paljastaa kliinisesti merkittäviä lääkehoidon kohteita tähän asti hoitoresistentin myoklonusoireen hallitsemiseksi, mikä aiheuttaa sairastuneille huomattavaa elämänlaadun laskua, työkyvyttömyyttä ja sairastuvuuden kasvua. EPM1-diagnoosien määrän arvioidaan tällä hetkellä olevan hienoisessa kasvussa harvinaiselle sairaudelle tyypillisen alidiagnostiikan vähentyessä ja modernin molekyylibiologisen diagnostiikan saatavuuden parantuessa. (5) Koska EPM1 on maailman myoklonusepilepsioista yleisin ja väestössämme yleisempi kuin missään muualla maailmassa, on Suomessa mahdollisuus ja vastuu yrittää löytää prekliinisen tutkimuksen keinoin taudin etenemiseen ja vaikeutumiseen vaikuttavia mekanismeja ja näiden mahdollisia biologisia hoitokohteita.

Lähteet

1. Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, et al. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*. 2007;131(6):1164-78.
2. Stephan AH, Barres BA, Stevens B. The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease. *Annu Rev Neurosci*. 2012;35:369-89.
3. Joensuu T, Tegelberg S, Reinmaa E, Segerstråle M, Hakala P, Pehkonen H, et al. Gene expression alterations in the cerebellum and granule neurons of *Cstb*^{-/-} mouse are associated with early synaptic changes and inflammation. *PLoS One*. 2014;9(2):e89321.
4. Tegelberg S, Kopra O, Joensuu T, Cooper JD, Lehesjoki AE. Early microglial activation precedes neuronal loss in the brain of the *Cstb*^{-/-} mouse model of progressive myoclonus epilepsy, EPM1. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 2012;71(1):40-53.
5. Crespel A, Ferlazzo E, Franceschetti S, Genton P, Gouider R, Kälviäinen R, et al. Unverricht-Lundborg disease. *Epileptic Disorders: international epilepsy journal with videotape*. 2016;18(S2):28-37.
6. Kestilä M, Ikonen E, Lehesjoki AE. [Finnish disease heritage]. *Duodecim; lääketieteellinen aikakauskirja*. 2010;126(19):2311-20.
7. Lehesjoki AE KR. Unverricht-Lundborg Disease GeneReviews® [Internet]: Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019; 2004 [updated 2014 Nov 26. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1142/>.
8. Pennacchio LA, Lehesjoki AE, Stone NE, Willour VL, Virtaneva K, Miao J, et al. Mutations in the gene encoding cystatin B in progressive myoclonus epilepsy (EPM1). *Science (New York, NY)*. 1996;271(5256):1731-4.
9. Pennacchio LA, Bouley DM, Higgins KM, Scott MP, Noebels JL, Myers RM. Progressive ataxia, myoclonic epilepsy and cerebellar apoptosis in cystatin B deficient mice. *Nature Genetics*. 1998;20(3):251-8.
10. Rinne R, Saukko P, Järvinen M, Lehesjoki AE. Reduced cystatin B activity correlates with enhanced cathepsin activity in progressive myoclonus epilepsy. *Annals of Medicine*. 2002;34(5):380-5.
11. Turk B, Turk D, Turk V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000;1477(1-2):98-111.
12. Joensuu T, Lehesjoki AE, Kopra O. Molecular background of EPM1-Unverricht-Lundborg disease. *Epilepsia*. 2008;49(4):557-63.
13. Virtaneva K, Paulin L, Krahe R, de la Chapelle A, Lehesjoki AE. The minisatellite expansion mutation in EPM1: resolution of an initial discrepancy. *Mutations in brief no. 186*. Online. *Human Mutation*. 1998;12(3):218.
14. Kälviäinen R, Khyuppenen J, Koskenkorva P, Eriksson K, Vanninen R, Mervaala E. Clinical picture of EPM1-Unverricht-Lundborg disease. *Epilepsia*. 2008;49(4):549-56.
15. Mancini GM, Schot R, de Wit MC, de Coo RF, Oostenbrink R, Bindels-de Heus K, et al. CSTB null mutation associated with microcephaly, early developmental delay, and severe dyskinesia. *Neurology*. 2016;86(9):877-8.
16. O'Brien A, Marshall CR, Blaser S, Ray PN, Yoon G. Severe neurodegeneration, progressive cerebral volume loss and diffuse hypomyelination associated with a homozygous frameshift mutation in CSTB. *EJHG*. 2017;25(6):775-8.
17. Pinto E, Freitas J, Duarte AJ, Ribeiro I, Ribeiro D, Lima JL, et al. Unverricht-Lundborg disease: homozygosity for a new splicing mutation in the cystatin B gene. *Epilepsy Research*. 2012;99(1-2):187-90.
18. Bespalova IN, Pranzatelli M, Burmeister M. G to C transversion at a splice acceptor site causes exon skipping in the cystatin B gene. *Mutation Research*. 1997;382(1-2):67-74.

19. Lafreniere RG, Rochefort DL, Chretien N, Rommens JM, Cochius JI, Kälviäinen R, et al. Unstable insertion in the 5' flanking region of the cystatin B gene is the most common mutation in progressive myoclonus epilepsy type 1, EPM1. *Nature Genetics*. 1997;15(3):298-302.
20. Lalioti MD, Mirotsoy M, Buresi C, Peitsch MC, Rossier C, Ouazzani R, et al. Identification of mutations in cystatin B, the gene responsible for the Unverricht-Lundborg type of progressive myoclonus epilepsy (EPM1). *Am J Hum Genet*. 1997;60(2):342-51.
21. Erdinc OO, JT, Ilgen-Uslu F, Bebek N, Ozkara C, Tutkavul K et al. . Unverricht-Lundborg Disease in Turkey: Delineating The Phenotype Between Cystatin B Mutation Positive and Negative Cases. *Journal of Neurological Sciences*. 2010(2010;27(1):111).
22. Assenza G, Benvenga A, Gennaro E, Tombini M, Campana C, Assenza F, et al. A novel c132-134del mutation in Unverricht-Lundborg disease and the review of literature of heterozygous compound patients. *Epilepsia*. 2017;58(2):e31-e5.
23. Canafoglia L, Gennaro E, Capovilla G, Gobbi G, Boni A, Beccaria F, et al. Electroclinical presentation and genotype-phenotype relationships in patients with Unverricht-Lundborg disease carrying compound heterozygous CSTB point and indel mutations. *Epilepsia*. 2012;53(12):2120-7.
24. Joensuu T, Kuronen M, Alakurtti K, Tegelberg S, Hakala P, Aalto A, et al. Cystatin B: mutation detection, alternative splicing and expression in progressive myoclonus epilepsy of Unverricht-Lundborg type (EPM1) patients. *EJHG*. 2007;15(2):185-93.
25. Kagitani-Shimono K, Imai K, Okamoto N, Ono J, Okada S. Unverricht-Lundborg disease with cystatin B gene abnormalities. *Pediatric Neurology*. 2002;26(1):55-60.
26. de Haan GJ, Halley DJ, Doelman JC, Geesink HH, Augustijn PB, Jager-Jongkind AD, et al. Unverricht-Lundborg disease: underdiagnosed in the Netherlands. *Epilepsia*. 2004;45(9):1061-3.
27. Bessalova IN, Adkins S, Pranzatelli M, Burmeister M. Novel cystatin B mutation and diagnostic PCR assay in an Unverricht-Lundborg progressive myoclonus epilepsy patient. *American Journal of Medical Genetics*. 1997;74(5):467-71.
28. Eldridge R, Iivanainen M, Stern R, Koerber T, Wilder BJ. "Baltic" myoclonus epilepsy: hereditary disorder of childhood made worse by phenytoin. *Lancet (London, England)*. 1983;2(8354):838-42.
29. Manninen O, Koskenkorva P, Lehtimäki KK, Hyppönen J, Könönen M, Laitinen T, et al. White matter degeneration with Unverricht-Lundborg progressive myoclonus epilepsy: a translational diffusion-tensor imaging study in patients and cystatin B-deficient mice. *Radiology*. 2013;269(1):232-9.
30. Franceschetti S, Sancini G, Buzzi A, Zucchini S, Paradiso B, Magnaghi G, et al. A pathogenetic hypothesis of Unverricht-Lundborg disease onset and progression. *Neurobiology of disease*. 2007;25(3):675-85.
31. Lehtinen MK, Tegelberg S, Schipper H, Su H, Zukor H, Manninen O, et al. Cystatin B deficiency sensitizes neurons to oxidative stress in progressive myoclonus epilepsy, EPM1. *J Neurosci*. 2009;29(18):5910-5.
32. Okuneva O, Li Z, Korber I, Tegelberg S, Joensuu T, Tian L, et al. Brain inflammation is accompanied by peripheral inflammation in *Cstb*^{-/-} mice, a model for progressive myoclonus epilepsy. *Journal of Neuroinflammation*. 2016;13(1):298.
33. Chu Y, Jin X, Parada I, Pesic A, Stevens B, Barres B, et al. Enhanced synaptic connectivity and epilepsy in C1q knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(17):7975-80.
34. Yuzaki M. The C1q complement family of synaptic organizers: not just complementary. *Current Opinion in Neurobiology*. 2017;45:9-15.
35. Rosen AM, Stevens B. The role of the classical complement cascade in synapse loss during development and glaucoma. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2010;703:75-93.

36. Sekar A, Bialas AR, de Rivera H, Davis A, Hammond TR, Kamitaki N, et al. Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature*. 2016;530(7589):177-83.
37. Veerhuis R, Nielsen HM, Tenner AJ. Complement in the brain. *Molecular Immunology*. 2011;48(14):1592-603.
38. Eroglu C, Barres BA. Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature*. 2010;468(7321):223-31.
39. Lui H, Zhang J, Makinson SR, Cahill MK, Kelley KW, Huang HY, et al. Progranulin Deficiency Promotes Circuit-Specific Synaptic Pruning by Microglia via Complement Activation. *Cell*. 2016;165(4):921-35.
40. Song JW, Mischak T, Kang H, Knecht S, Lu J, Cao Y, et al. Lysosomal activity associated with developmental axon pruning. *J Neurosci*. 2008;28(36):8993-9001.
41. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science (New York, NY)*. 2002;296(5566):298-300.
42. Karhu J, Hari R, Paetau R, Kajola M, Mervaala E. Cortical reactivity in progressive myoclonus epilepsy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1994;90(2):93-102.
43. Koskenkorva P, Niskanen E, Hyppönen J, Könönen M, Mervaala E, Soininen H, et al. Sensorimotor, visual, and auditory cortical atrophy in Unverricht-Lundborg disease mapped with cortical thickness analysis. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2012;33(5):878-83.

Kuva 2. Allen Institute for Brain Science (2018). Allen Mouse Brain Atlas. Mouse brain coronal section, P54.

<http://atlas.brain-map.org/atlas?atlas=1&plate=100960368#atlas=1&plate=100960368&resolution=16.41&x=4232.040824142156&y=3479.9027461631626&zoo m=-3> , 29.11.2018.

Liitteet

Liite 1. Immunofluoresenssivärjäys-protokolla

Hiiren 40 µm koronaalitason isoavoleikkeitä nostettiin siveltimellä 12-kuoppalevyille joka 12. leike (1/12-sarja). Tässä järjestyksessä saatiin edustavasti jokaisen yksilön aivokudoksesta samasta anatomisesta kohdasta leikattu leike. Kunkin hiiren leikesarja nostettiin omaan kuoppaansa Tris-puskuroituun suolaliuokseen (TBS, 1 ml/kuoppa).

1. Pestiin 3 x 5 min TBS:ssä.
2. Inkuboitiin huoneenlämmössä 60 minuutin ajan 50 mM NH₄Cl – TBS:ssä (quenching). Tässä vaiheessa vapaat aldehydiryhvät reagoivat koko kudოსleikkeessä autofluoresenssia vähentäen.
3. Pestiin 3 x 5 min TBS:ssä.
4. Inkuboitiin 15% vasikanseerumissa (foetal calf serum, FCS) TBST:ssä (0.3% Tx-100) huoneenlämmössä 60 minuutin ajan (blocking). Tämä vähentää seuraavaksi lisättävien vasta-aineiden epäspesifistä sitoutumista ja tästä syntyvää kuvannusvaiheen taustasignaalia.
5. Primääriset vasta-aineet laimennettiin 10% seerumiin TBST:ssä (0.5 ml/kuoppa). Jätettiin inkuboitumaan yön yli +4°C lämpötilassa.
6. Pestiin 3 x 15 min TBS:ssä.
7. Sekundaariset vasta-aineet laimennettiin 10% seerumiin TBST:ssä (0.5 ml/kuoppa). Jätettiin inkuboitumaan huoneenlämpöön kahdeksi tunniksi valolta suojattuna.
8. Pestiin 3 x 5 min TBS:ssä valolta suojattuna.
9. Säilytettiin +4°C lämpötilassa TBS:ssä valolta suojattuna.
10. Siirrettiin siveltimellä kromi-gelatiinipäällystetyille objektilaseille (liite 2) käyttäen ensin TBS:n, sitten puhdistetun veden kautta. Annettiin kuivua 1-2 tuntia huoneenlämmössä valolta suojattuna.
11. Päällystettiin peitinlaseilla käyttäen vesiliukoista mounting-ainetta (FluoroMount, F4680, Sigma). Säilytettiin +4°C lämpötilassa valolta suojattuna.

Liite 2. Kromi-gelatiinipäälyste objektilaseille

1. Lämmitettiin 300 ml käänteisosmoosivettä 45°C lämpötilaan.
2. Lisättiin 1.50 g gelatiinia. Annettiin liueta lähes täydellisesti.
3. Lisättiin 0.50 g Kromi(III)-kaliumsulfaattidodekahydraattia ($\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$). Suodatettiin 0.45 μm suodattimella mahdollisten liukenemattomien hiukkasten suodattamiseksi.
4. Lämmitettiin liuos 60°C lämpötilaan vesihauteessa.
5. Kastettiin objektilasit telineessä gelatiiniliuokseen. Jätettiin kuivumaan yön yli.
6. Säilytettiin huoneenlämmössä.